

HEAT DEVELOPABLE PHOTSENSITIVE MATERIAL

Patent number: JP2236542
Publication date: 1990-09-19
Inventor: YOKOGAWA TAKUYA
Applicant: FUJI PHOTO FILM CO LTD
Classification:
- **international:** G03C1/08; G03C1/498; G03C8/40
- **european:**
Application number: JP19890058079 19890310
Priority number(s): JP19890058079 19890310

Report a data error here

Abstract of JP2236542

PURPOSE: To prevent thermal fogging by incorporating a part contg. polyvalent metal ions at a specific ratio or above into a photosensitive silver halide at $\geq 10\%$ weight of the silver halide.

CONSTITUTION: The Frenkel balance in silver halide particles collapses and the concn. of interlattice silver ions lower when a large amt. of the polyvalent metal ions are doped. On the other hand, the silver ion vacancy concn. having the equil. relation with the interlattice silver ions increases. The salt of the polyvalent metal ions is required to be made present during the particle formation of the silver halide in order to dope a large amt. of the polyvalent metal ions. The part where the silver ion vacancy governs, namely, the part where the polyvalent metal ions are doped at $\geq 1 \times 10^{-4}$ mol/molAg is required to be $\geq 10\%$ of the weight of the total silver halide even if any structure is assumed. The heat developable photosensitive material which prevents the thermal fogging is obtd. in this way without hindering the development.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-236452

⑬ Int. Cl.⁸ 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 平成2年(1990)9月19日
G 01 N 33/53 L 7906-2G
V 7906-2G
B 7906-2G
C 12 N 33/577
5/20
15/06
C 12 P 21/08 8214-4B
(C 12 P 21/08
C 12 R 1:91)
8515-4B C 12 N 5/00 B
8717-4B 15/00 C
審査請求 未請求 請求項の数 3 (全8頁)

⑮ 発明の名称 活性化ヒトプロテインCとヒトプロテインCインヒビターの複合体
の測定方法および測定試薬

⑯ 特 願 平1-58123

⑰ 出 願 平1(1989)3月10日

⑱ 発 明 者 鈴木 宏 治 三重県津市上浜町6-4-35

⑲ 出 願 人 エーザイ株式会社 東京都文京区小石川4丁目6番10号

⑳ 代 理 人 弁理士 古 谷 馨

明 細 書

1. 発明の名称

活性化ヒトプロテインCとヒトプロテイン
Cインヒビターの複合体の測定方法および
測定試薬

2. 特許請求の範囲

1. 活性化ヒトプロテインCとヒトプロテイン
Cインヒビターの複合体を二抗体サンドイッ
チ法を利用する酵素免疫測定法によって測定
するにあたり、当該測定に係わる固相化用抗
体として抗ヒトプロテインCインヒビターモ
ノクローナル抗体を使用し、酵素標識抗体用
として抗ヒトプロテインCモノクローナル抗
体を使用することを特徴とする測定方法。

2. 活性化ヒトプロテインCとヒトプロテイン
Cインヒビターの複合体を二抗体サンドイッ
チ法を利用する酵素免疫測定法によって測定
する試薬において、当該測定に係わる固相化
用抗体として抗ヒトプロテインCインヒビタ
ーモノクローナル抗体が含まれ、酵素標識抗

体用として抗ヒトプロテインCモノクローナ
ル抗体が含まれることを特徴とする測定試薬。

3. 測定試薬が播種性血管内凝固症候群の診断
試薬である請求項2記載の測定試薬。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は活性化ヒトプロテインCとヒトプロ
テインCインヒビターの複合体(以下 APC-PCI
Complex または CICと略記する)の測定方法お
よび測定試薬に関する。さらに詳しくは、APC-
PCI Complex (CIC) を二抗体サンドイッチ法を
利用する酵素免疫測定法によって測定する測定
方法および測定試薬に関する。

〔従来の技術及び発明が解決しようとする課題〕

ヒトプロテインC(以下PCと略記する)はビ
タミンK依存性血液凝固蛋白質の一つで、糖含量23
%の二本鎖から成る分子量約62000 の蛋白質で
あり、血液凝固の生理的制御因子として、非常
に重要な役割を果たしている。PCは循環血液中
では通常、不活性型の前駆酵素として存在する。

なんらかの原因により凝固系が作動しトロンビンが生成されると、トロンビンは速やかに血管内皮細胞表面に存在するトロンボモジュリンと結合し、トロンビン-トロンボモジュリン複合体を形成する。PCは、このトロンビン-トロンボモジュリン複合体により活性化され、活性化ヒトプロテインC（以下APCと略記する）となる。APCは凝固反応の調節素である活性化第Ⅲ因子と活性化第Ⅴ因子を分解し凝固反応を制御する。

血液中にはAPCに対するインヒビターとして、プロテインCインヒビター（以下PCIと略記する）が存在する。PCIは分子量57000の一本鎖糖蛋白質で、APCと等モルのアシル結合による複合体を形成し、APCを阻害する。

ヒトの血中PCの測定法には、生物活性測定法と免疫学的測定法とが報告されている。また、PCIについても生物活性測定法と免疫学的測定法とが確立されている。しかし、APC-PCI Complex (CIC)の測定については未だ有用かつ実用

的な方法ならびに試薬が提供されていない。なお、PCおよびPCIの精製および測定法について参考のために下記文献1)～3)を列挙する。

- 1) Suzuki K, Nishioaka J, Washimoto S.,
Protein C Inhibitor, Purification from Human Plasma and Characterization,
J. Biol. Chem., 1983;258:163
- 2) Suzuki K, Stenflo J, Dahlback B, Teodorsson B.,
Inactivation of Human Coagulation Factor V by Activated Protein C,
J. Biol. Chem., 1983;258:1918
- 3) 鈴木 宏治,
プロテインC,
臨床検査, 1984;28:25

さて、播種性血管内凝固症候群(Disseminated intravascular coagulation: DICと略す)とは、全身の主として細小血管内に血栓が多発し、止血障害、血栓による諸臓器障害・ショック・末梢循環不全を呈する病態である。DIC発症の基

礎疾患としては、悪性腫瘍が45.2%と最も多く、次いで感染症、白血病、肝疾患の順となっており、これらの疾患において早期にDICを発見し、早期に治療することがDICに対する最善の対策である。

現在、DICのスクリーニング方法としては、血小板数、プロトロンビン時間、血漿フィブリノゲン・血漿PDP(フィブリノーフィブリノゲン分解物)が測定されている。その他補助診断として、血漿アンチトロンビンⅢ、血漿 α_2 -プラスミンインヒビターが測定されている。また、DICにおいては、PCおよびPCIが正常人に比較して低下している。

しかしながら、これらのスクリーニング方法により早期にDICを診断することは困難であり、より早期に診断を可能とする臨床検査方法が求められていた。

(課題を解決するための手段)

かかる実情に鑑み本発明者は、APC-PCI Complex (CIC)を簡便に測定することができ、とり

わけ臨床検査の場において多数の検体を同時に処理することのできる実用的な方法を求めて検討を行った。その結果、抗ヒトプロテインCモノクローナル抗体（以下抗PC抗体と略記する）および抗ヒトプロテインCインヒビターモノクローナル抗体（以下抗PCI抗体と略記する）を使用する二抗体サンドイッチ酵素免疫測定法を実施することにより課題が解決されることを見出し、また、本発明試薬は、DICの早期診断を可能とすることも知るに至り、本発明を完成した。

即ち、本発明は、APC-PCI Complex (CIC)を二抗体サンドイッチ法を利用する酵素免疫測定法によって測定するにあたり、当該測定に係わる固相化用抗体として抗PCI抗体を使用し、酵素標識抗体用として抗PC抗体を使用することを特徴とする測定方法、及びAPC-PCI Complex (CIC)を二抗体サンドイッチ法を利用する酵素免疫測定法によって測定する試薬において、当該測定に係わる固相化用抗体として抗PCI抗体が含ま

れ、酵素標識抗体用として抗PC抗体が含まれることを特徴とする測定試薬を提供するものである。

以下に本発明を詳細に説明する。

APC-PCI Complex (CIC) を二抗体サンドイッチ酵素免疫測定法で測定するためには、APC と反応する抗APC 抗体と、PCI と反応する抗PCI 抗体が必要である。APC とPCは共通抗原性を持つので抗PC抗体の使用が可能である。

本発明に係わる抗PC抗体は例えば次のように製造されるが、市販の抗PC抗体を使用することもできる。

まずPCを用意する。このためにはヒト血清にバリウム塩を加えて沈殿後、エチレンジアミン四酢酸塩 (EDTA) 溶出し、DEAE-Sephacel、Heparin-Sepharose により精製する。精製方法は前記文献2) に詳細に述べられている。

用意したPC 50 μ gを同容量のフロイント完全アジュバントと共にBALB/cマウスの腹腔内に投与し、さらに15 μ gを2週間後に尾静脈内へ投与

し、3日後に脾臓細胞を採取し、Köhler and Milsteinの方法 (下記文献4) 参照) によりミエローマ細胞株P3U1と細胞融合し、限昇希釈法により3回クローニングを行い、抗PC抗体産生セルラインとして確立される。

本発明に係わるモノクローナル抗PCI 抗体は次のように製造される。

まずPCI を用意する。このためにはヒト血清にバリウム塩を加え、PCなどのビタミンK依存性蛋白質を除き、その上清にPEG-6000を加え、その沈殿を集め、溶出し、DEAE-Sepharose、硫酸アンモニウム分画、Dextran Sulfate-Agarose Chromatography、Ultrogel AcA44、DEAE-Sephacel Chromatographyにより精製する。精製方法は前記文献1) に詳細に述べられている。

用意したPCI 50 μ gを同容量のフロイント完全アジュバントと共にBALB/cマウスの腹腔内に投与し、さらに15 μ gを2週間後に尾静脈内へ投与し、3日後に脾臓細胞を採取し、Köhler and Milsteinの方法 (下記文献4) 参照) によりミ

エローマ細胞株P3U1と細胞融合し、限昇希釈法により3回クローニングを行い、抗PCI 抗体産生セルラインとして確立される。

4) Köhler G, Milstein C.,

Deviation of specific antibody-producing culture and tumor lines by cell fusion, Eur. J. Immunol., 1976;6:511

次に本発明における二抗体サンドイッチ法を利用するAPI-PCI Complex (CIC) の酵素免疫測定法は次のように実施される。

測定系全体の構成要素は固相、固相コート用の抗PCI 抗体 (第一抗体)、標準抗原、標識用抗PC抗体 (第二抗体)、酵素および基質である。固相としては、例えばエンザイムイムノアッセイ用マイクロタイタープレートのウェルあるいはポリスチレン等のプラスチックビーズを用いればよい。測定に先立ち抗PCI モノクローナル抗体を炭酸緩衝液に溶解し、4℃で一晩放置すれば固相表面はコートされる。しかし、モノクローナル抗体によってコートされていない表面

部分もあるので、この部分に対しては牛血清アルブミンをリン酸緩衝液に溶解してウェルに加え、二時間室温に放置して牛血清アルブミンによってコートする。

酵素標識抗PC抗体 (抗PC抗体は『抗ヒトプロテインC』としてバイオスコット社・コスモ・バイオ株式会社販売より入手することもできる) は次のように製造すれば良い。酵素としてはアルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ等を使用することができる。測定に先立ち、酵素を抗PC抗体にグルタルアルデヒド、あるいはマレイミド化合物により結合せしめてコンジュゲートとし、本発明の測定方法の実施のための試薬の一部として予め準備しておくことができる。結合方法は、例えば下記文献5) のマレイミド法により標識すれば良い。

5) Yoshitake S, Imagawa N, Ishikawa E, et al., Mild and Efficient Conjugation of Rabbit Fab' and Horseradish Peroxidase

Using a Maleimide Compound and Its Use
for Enzyme Immunoassay,

J. Biochem., 1982;92:1413

基質は選択した酵素に応じて適宜使用すれば良い。例えば酵素としてアルカリフォスファターゼを選択した場合においてp-ニトロフェニルフォスフェートを、またペルオキシダーゼを選択した場合においてはo-フェニレンジアミン、あるいはABTS (2,2'-アジノービス (3'-エチルベンゾチアゾリンスルホン酸)) を発色剤として使用し、過酸化水素を基質として使用すれば良い。

測定は二抗体サンドイッチ法を利用する酵素免疫測定法における手順に従って行う。測定に先立って血清、血漿等の検体の前処理としてバリウム塩を添加する。添加後1時間攪拌し遠心分離して沈澱を得る。この操作によりγ-カルボキシグルタミン酸を有するPCI、APC、APC-PCI Complex (CIC) はバリウム塩と結合して沈澱し、検体中の大部分の未反応のPCIは上清に残り、

APC-PCI Complex (CIC) と分離される。この操作を行わない場合には、大部分の未反応のPCIが固相の抗PCI抗体と反応するためにAPC-PCI Complex (CIC) の測定は不可能である。沈澱にEDTA含有トリス緩衝液を加えて溶解し検体とする。検体の測定は後記実施例に示されるごとく抗PCI抗体をコートした固相に検体を加えてインキュベートする。固相を洗浄後、酵素標識抗PCI抗体を加えて再びインキュベートし、洗浄し、最後に基質を加えてインキュベートする。反応を停止せしめてから、基質の分解量を分光光度計を用いて測定する。

次に、本発明の測定試薬は本発明の測定方法の実施に直接使用する試薬であり、測定方法におけると同一の目的を達成するものである。従って本発明測定試薬の具体的態様を示せば次のようになる。

即ち、本発明測定試薬は固相化抗PCI抗体、酵素標識抗PCI抗体を必須の構成要素として含み、また測定の実施の便益のために適当なる標準抗

原、前処理剤、抗原希釈液、反応溶液、基質、基質溶解液、反応停止液等がセット中に添付されることは自由であり、これらは本発明を限定するものではない。

後記実施例によって示されるごとく、本発明測定試薬によってDICの早期診断が可能であり、本発明測定試薬はDICの診断試薬として使用することができる。

本発明の効果は次のごとく要約される。

まず本発明は従来測定が不可能であったAPC-PCI Complex (CIC) を、二抗体サンドイッチ法を利用する酵素免疫測定法により測定するものであり、操作が単純簡明であり、臨床検査の場に対して実用性が高い。また、DICないし深部静脈血栓の早期診断を可能とする。

(実施例)

以下に記載する実施例をもって本発明を更に具体的に説明する。

実施例1

1) 新鮮血漿4mlに塩酸ベンザミジン (10mM)、

フルオロリン酸ジイソプロピル (DPP) (1mM)、フッ化フェニルメチルスルホン (PMSF) (1mM) およびダイズトリプシンインヒビター (50mg/l) を加え、1M NaCl を320 ml滴下した。以下の精製操作は、すべて4℃で行った。1時間攪拌後、5000回転で30分間遠心し、上清を採取し固形PEG-8000を60g/l加えた。1時間攪拌後、5000回転で15分間遠心し、沈澱を廃棄した。更に上清に固形PEG-8000を80g/l加え、1時間攪拌後、5000回転で30分間遠心し沈澱を採取した。沈澱に0.05M トリス-塩酸緩衝液pH7.5 (0.1M NaCl)、塩酸ベンザミジン (10mM)、DPP (1mM)、PMSF (1mM) を500 ml加えて溶解した。溶解に使用した緩衝液と同一の緩衝液で平衡化したDBAE-Sepharose CL-6Bカラムにかけ、素通り画分を採取した。採取液に硫酸アンモニウム粉末を加えて50%飽和とし、1時間攪拌後、8000回転で15分間遠心し、上清を採取した。更に硫酸アンモニウム粉末を加えて70%飽和とし、1時間攪拌後、

8000回転で30分間遠心し、沈澱を採取した。沈澱に0.05M トリス-塩酸緩衝液pH7.0 (0.1 M NaCl、塩酸ベンザミジン (1mM)、DPP (0.1 mM)、PHSP (0.1mM))を加えて溶解し、同一緩衝液に対して透析した。Dextran Sulfate - Agarose カラムにかけ、PCI 画分に硫酸アンモニウム粉末を加えて80%飽和とした。10000回転で15分間遠心し沈澱を採取し、溶解可能な最小液量の0.05M トリス-塩酸緩衝液pH7.5 (0.15M NaCl)に溶解した後、AcA-44 Ultragel カラムにかけ、PCI 画分を集め0.05M トリス-塩酸緩衝液pH9.0に透析した。透析後、DEAE-Sephacel にかけ、精製PCI を得た。その最終回収率は9%であった。

- 2) 精製したPCI 50 μ gを同容量のフロイント完全アジュバントと共にBALB/cマウス(メス、8週齢)の腹腔内に投与し、更に15 μ gを2週間後に尾静脈内へ投与し、3日後に脾臓細胞を抽出し、ミエローマ細胞株P3U1と細胞融合した。細胞融合はポリエチレングリコール4000

を用いてKöhler and Milstein の方法(文献4))で行った。次に96ウエルマイクロプレートを用いて限界希釈法によりPCI と反応するハイブリドーマを3回クローニングし、抗PCI抗体産生セルラインとして確立した。セルラインの保存培地としては牛胎児血清を10%に含むRPMI1640培地を使用した。セルラインよりモノクローナル抗PCI 抗体を常法により得た。

- 3) 得られた抗PCI 抗体を0.1M炭酸緩衝液pH9.3で3 μ g/ μ lに希釈し、96ウエルマイクロプレートに1ウエルにつき100 μ lずつ注入し、4℃で一晩放置した。0.05M トリス-塩酸緩衝液pH7.5 (0.2M NaCl、0.5%牛血清アルブミン、0.05%Tween-20、0.05mM EDTA、0.02%チメロサル)で3回洗浄後、5%牛血清アルブミン(0.5%ゼラチン、リン酸緩衝液pH7.5)150 μ lを注入して2時間放置し、前記緩衝液で3回洗浄して、抗体コート面相を用意した。

実施例2

- 1) 新鮮血漿4.4 μ lに塩酸ベンザミジン (10mM)、DPP (1mM)、PHSP (1mM)およびダイズトリプシンインヒビター(50mg/ μ l)を加え、1M NaCl₂を350 μ l滴下した。以下の精製操作はすべて4℃で行った。1時間攪拌後、5000回転で30分間遠心し、沈澱を採取した。沈澱に0.15M NaCl (5mM塩酸ベンザミジン) pH7.4を700 μ l加えて二回洗浄した。バリウム塩に吸着した蛋白質は、0.2M EDTA pH7.4 (5mM塩酸ベンザミジン、0.1mM DPP)を860 μ l添加することにより溶出した。懸濁液を1時間攪拌後、5000回転で30分間遠心し、沈澱を除去した。上清を0.1Mリン酸緩衝液 pH6.0 (1mM 塩酸ベンザミジン)に透析したのち、透析に使用した緩衝液と同一の緩衝液で平衡化したDEAE-Sephacel カラムにかけ、0.1Mから0.7M NaCl までの直線的濃度勾配 (0.1Mリン酸緩衝液pH5.0、1mM塩酸ベンザミジン)で溶出し、PC画分を採取した。採取液を0.05M トリス-塩酸緩衝液pH8.0 (1mM塩酸ベンザミジン)に対して透析

した。透析後、DPPを1mMになるように、PHSPを0.1mM になるように添加した。0.05M トリス-塩酸緩衝液pH8.0 (1mM塩酸ベンザミジン)で平衡化したDEAE-Sephacel カラムにかけ、0 M から0.5M NaCl まで直線的濃度勾配 (0.05 M トリス-塩酸緩衝液pH8.0、1mM 塩酸ベンザミジン、2mM CaCl₂)で溶出し、PC画分を採取した。採取液を50mMイミダゾール緩衝液pH6.0 (1mM塩酸ベンザミジン)に透析した。透析により生じた沈澱を20000 回転で10分間遠心して除去した。上清にCaCl₂を2 mMになるように加え、50mMイミダゾール緩衝液pH6.0 (1mM塩酸ベンザミジン、2mM CaCl₂)で平衡化したHeparin-Sepharose カラムにかけ、0 M から0.8M NaCl まで直線的濃度勾配 (50mM イミダゾール緩衝液pH6.0、1mM 塩酸ベンザミジン)で溶出し、精製PCを採取した。その最終回収率は25%であった。

- 2) 精製したPC 50 μ gを同容量のフロイント完全アジュバントと共にBALB/cマウス(メス、

8週齢)の腹腔内に投与し、更に15歳を2週間後に尾静脈内へ投与し、3日後に脾臓細胞を摘出し、ミエローマ細胞株P3U1と細胞融合した。細胞融合はポリエチレングリコール4000を用いてKöhler and Milsteinの方法(文献4))で行った。次に96ウェルマイクロプレートを用いて限昇希釈法によりPCと反応するハイブリドーマを3個クローニングし、抗PC抗体産生セルラインとして確立した。セルラインの保存増地としては牛胎児血清を10%に含むRPMI1640増地を使用した。セルラインよりモノクローナル抗PC抗体を常法により得た。

3) 抗PC抗体5mgを0.1M酢酸緩衝液pH4.2で透析した後、ブタ胃・ペプシン0.2mgを加え37℃で24時間インキュベートした。pHを7.0に合わせた後、Ultrogel AcA44カラムにかけて0.1Mリン酸緩衝液pH7.0でゲル濾過を行い、F(ab')₂を得る。F(ab')₂を0.1Mリン酸緩衝液pH6.0に透析した後、0.1Mメルカプトエチルアミン(0.1Mリン酸緩衝液pH6.0、5mM EDTA)

50mMを添加し37℃で90分間インキュベートした。0.1Mリン酸緩衝液pH6.0(5mM EDTA)で平衡化したSephadex G25カラムに通して透析を行い、Fab-SHを得た。一方、酵素として西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ(HRPと略す)2mgを0.1Mリン酸緩衝液pH7.0に溶解し、N-スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート0.7mg(N,N-ジメチルホルムアミドに溶解する)を添加し30℃で60分間インキュベートした。0.1Mリン酸緩衝液pH6.0で平衡化したSephadex G25カラムに通して透析を行い、マレイミド化HRPを得た。Fab-SHとマレイミド化HRPとを混合して4℃で一週間インキュベートし、0.1Mリン酸緩衝液pH6.5で平衡化したUltrogel AcA44カラムでゲル濾過を行いHRP標識抗PC抗体を得た。

実施例1で得られた抗体コート固相および実施例2で得られた酵素標識抗体を組み合わせてセットとし、本発明測定試薬とした。

実施例3

被検血清あるいは血清の前処理は、次のように行った。血清あるいは血清検体150μlに0.38%クエン酸ナトリウム(0.1Mトリス-塩酸緩衝液pH7.5、0.15M NaCl)600μlを加えた後、1M BaCl₂を60μl滴下し、1時間氷冷下で攪拌後、15000回転で5分間遠心し沈澱を得た。沈澱に0.2M EDTA(0.1Mトリス-塩酸緩衝液pH7.5、0.15M NaCl)50μlを加えて溶解し、アッセイ緩衝液として、0.05Mトリス-塩酸緩衝液pH7.5(0.2M NaCl、0.5%牛血清アルブミン、0.05%Tween-20、0.05mM EDTA、0.02%チメロサル)を250μl加え、そのうちの100μlを被検検体として使用した。

実施例4

実施例1における抗体コート固相に1ウェル当たり実施例3の被検検体100μlを注入し、室温で一週間インキュベートする。0.05Mトリス-塩酸緩衝液pH7.5(0.2M NaCl、0.5%牛血清アルブミン、0.05%Tween-20、0.05mM EDTA、

0.02%チメロサル)で三回洗浄後、実施例2における酵素標識抗体100μlを加えて室温で60分間インキュベートする。0.05Mトリス-塩酸緩衝液pH7.5(0.2M NaCl、0.5%牛血清アルブミン、0.05%Tween-20、0.05mM EDTA、0.02%チメロサル)で三回洗浄後、2mg/ml濃度のo-フェニレンジアミン(クエン酸緩衝液pH4.85、0.03%過酸化水素)100μlを加えて室温に30分間放置し、分光光度計により波長490nmの吸光度を測定する。

(発明の効果)

以下に記載する実験例をもって本発明の効果を説明する。

実験例1

試料および方法

正常ヒト血清1ml当たり1M BaCl₂0.4mlを加えて氷冷下60分間攪拌し、APC-PCI Complex(CIC)を吸着除去した血清(試料a)を用意した。次に試料aに、前記実施例2で得られたPCを活性化したAPCと実施例1で得られたPCIを

反応させて調製したAPC-PCI Complex (CIC) の標準品を160ng/mlになるように加え、標準抗原溶液とした。前記実施例3および4におけると同じ手順に従って測定を行った。

結 果

結果を図1に示す。図1の横軸は、被検検体中のAPC-PCI Complex (CIC) の濃度を表し、縦軸は波長490nmの吸光度値を表す。図1より本発明はAPC-PCI Complex (CIC) に対して特異性が高く、かつ検量性が良いことが判明した。

実験例2

試料および方法

DIC患者血漿50例、ワーファリン服用患者血漿19例、肝臓疾患患者血漿10例および健康成人血漿20例について前記実施例3および4におけると同じ手順に従って測定を行った。

結 果

結果を図2に示す。図2の左欄は健康成人血漿についてであり、APC-PCI Complex (CIC) の測定値の平均は0.57ng/mlであった。また、ワ

ーファリン服用患者血漿および肝臓疾患患者血漿のAPC-PCI Complex (CIC) の測定値の平均は、それぞれ0.37ng/ml、1.64ng/mlであった。それに対して、DIC患者血漿のAPC-PCI Complex (CIC) の測定値の平均は3.23 ng/mlであり、高い値を示し、DICの診断に有用であることが判明した。

実験例3

試料および方法

急性前骨髄球性白血病患者1例の経過観察を40日にわたる長期間行い、PDP、PCI、PCの測定と同時に、前記実施例3および4におけると同じ手順に従ってAPC-PCI Complex (CIC) の測定を行った。

結 果

結果を図3に示す。APC-PCI Complex (CIC) の測定値は、他の凝固検査の測定値に比較して早期に高値を示し、DICの早期診断が可能となることが判明した。

4. 図面の簡単な説明

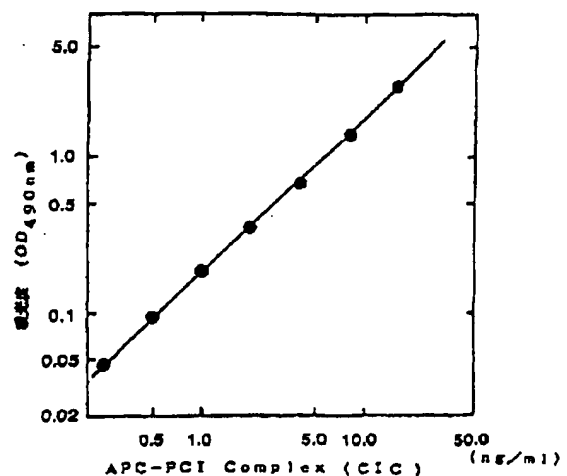
図1は実験例1の結果を示すグラフであり、

本発明測定方法によるAPC-PCI Complex (CIC) と波長490nmの吸光度値との間の関係を表すグラフである。

図2は実験例2の結果を示すグラフであり、健康成人および各種疾患患者のAPC-PCI Complex (CIC) の測定値を表すものである。

図3は実験例3の結果を示すグラフであり、一人の急性前骨髄球性白血病患者のPDP、PCI、PC、APC-PCI Complex (CIC) の測定値を経時的に追跡した結果である。

図1



出願人代理人 古 谷 孝 一

図2

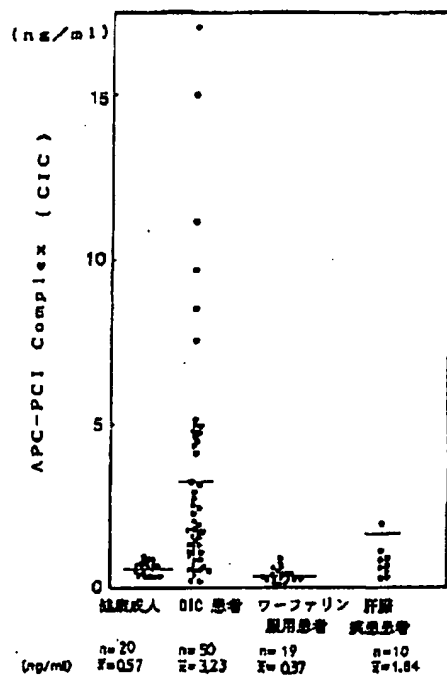


図3

